

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
RAFAELA SCARIOT DE MORAES

**CORRELAÇÃO ENTRE A ÁREA RADIOGRÁFICA E A IMUNOLOCALIZAÇÃO DA
MMP-2 E MMP-9 EM CISTOS DENTÍGEROS, CISTOS RADICULARES E
TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS UNILOCUARES**

CURITIBA
2010

RAFAELA SCARIOT DE MORAES

**CORRELAÇÃO ENTRE A ÁREA RADIOGRÁFICA E A IMUNOLOCALIZAÇÃO DA
MMP-2 E MMP-9 EM CISTOS DENTÍGEROS, CISTOS RADICULARES E
TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS UNILOCULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Estomatologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Cordeiro Gugisch

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson L. B. Rebellato

CURITIBA

2010

Moraes, Rafaela Scariot de

Correlação entre a área radiográfica e a imunolocalização da MMP-2 e MMP-9 em cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos uniloculares / Rafaela Scariot de Moraes – Curitiba, 2010.

73 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Professor Dr. Renato Cordeiro Gugisch

Co-Orientador: Professor Dr. Nelson L. B. Rebellato

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Saúde Bucal Durante a Infância e a Adolescência

Inclui bibliografia

1. Cistos maxilomandibulares. 2. Metaloproteínas. 3. Radiografia. I. Gugisch, Renato Cordeiro. II. Rebellato, Nelson L. B. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

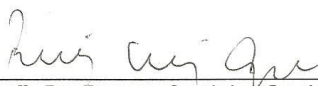
RAFAELA SCARIOT DE MORAES

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

CORRELAÇÃO ENTRE A ÁREA RADIOGRÁFICA E A IMUNO-LOCALIZAÇÃO
DA MMP-2 E MMP-9 EM CISTOS RADICULARES, CISTOS DENTÍGEROS E
TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS UNILOCAIS

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientadora:


Profº. Dr. Renato Cordeiro Gugisch
Departamento de Estomatologia, UFPR


Profª. Drª. Ângela Fernandes
Departamento de Estomatologia, UFPR


Profº. Dr. Allan Fernando Giovanini
Faculdade Positivo

Curitiba, 16 de dezembro de 2010.

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu amor, Rodrigo, pela compreensão.

Aos meus pais, Paulo e Sandra, pelo exemplo de vida.

A minha irmã, Mariela, pelo carinho.

A minha avó, Clecy, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Renato Cordeiro Gugisch, pela oportunidade de trabalharmos juntos, de uma forma muito produtiva e agradável.

Ao meu co-orientador e amigo, Professor Dr. Nelson Luis Barbosa Rebellato, por mais uma conquista juntos.

Ao Professor Dr. Allan Fernando Giovanini, bem como a Universidade Positivo, que me receberam prontamente para o desenvolvimento desse estudo.

Aos professores Dra. Ângela Fernandes e Dra. Fernanda de Moraes Ferreira, pela contribuição direta ou indireta na realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Fabian Fraiz Calixto pelo seu trabalho na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao meu amigo, Professor Dr. Delson João da Costa, pela presença constante.

A Disciplina de Diagnóstico Bucal, representada pelos Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira, Prof. Cleto Mariosvaldo Piazzetta e Prof. Dr. José Miguel Amenabar Céspedes, pelo auxílio durante o desenvolvimento de toda a pesquisa.

Ao Paulo, técnico em laboratório, que me ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, pelo apoio contínuo.

A Universidade Federal do Paraná, que me acolheu durante 10 anos, de uma forma inigualável e inesquecível.

Ao Governo Federal, através do Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pelo auxílio financeiro durante essa trajetória.

RESUMO

Introdução: As lesões císticas uniloculares intraósseas são as entidades patológicas mais comuns que afetam a região buco-maxilo-facial. O potencial proliferativo bem como a sua expansão ainda são incertos. Sugere-se que as metaloproteinases (MMPs) têm um papel importante no desenvolvimento de algumas condições patológicas. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi correlacionar os aspectos radiográficos (área) da lesão com a presença das MMPs-2 e -9 nos cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos.

Métodos: A amostra foi composta por dez espécimes de cistos dentígeros, nove cistos radiculares e oito tumores odontogênicos. A área radiográfica de cada lesão foi calculada a partir da fórmula matemática da área da elipse. Todos os espécimes foram submetidos à análise imunoistoquímica para estas enzimas. As imunolocalizações das MMPs-2 e -9 foram classificadas em escores, como ausente, presente ou fortemente presente. **Resultados e Conclusões:** A média das áreas radiográficas das lesões foi de 284,17 mm² para os cistos dentígeros, 235,81 mm² para os cistos radiculares e 381,81 mm² para os tumores odontogênicos. O resultado das análises estatísticas mostraram que a imunolocalização das MMPs e a área radiográfica das lesões não estão relacionadas para todas as lesões em questão ($p > 0,05$), exceto para a MMP-2 nos cistos radiculares ($p = 0,02/r_s = -0,659$), o que significa que quanto menor o cisto radicular maior a imunomarcação para essa enzima. A MMP-2 e a MMP-9 estão envolvidas com os cistos dentígeros e radiculares, relacionando-os com a expansão cística enquanto a MMP-2 e a MMP-9, nos tumores odontogênicos ceratocísticos, estão relacionadas a invasão, proliferação celular e consequentemente agressividade. Além disso, há uma associação inversa, nesse tumor, entre a imunomarcação da MMP-2 e MMP-9 ($p = 0,03/r_s = -0,660$), indicando imunoexpressões em regiões distintas.

Palavras-chave: CISTOS MAXILOMANDIBULARES. METALOPROTEÍNAS. RADIOGRAFIA.

ABSTRACT

Introduction: Unilocular bone cysts are the most common entities affecting the maxillofacial region. However, the mechanism of proliferation and expansion remains unclear. Metalloproteinases (MMPs) are associated to diverse pathological conditions. **Objective:** The aim of the present study was to correlate the radiographic aspect (area) and the presence of MMP-2 and MMP-9 in dentigerous cysts, radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. **Material and methods:** The sample was composed by 10 dentigerous cysts, 9 radicular cysts and 8 keratocystic odontogenic tumors. The radiographic area of each lesion was calculated using the mathematical formula of the ellipse area. All specimens were subjected to immunohistochemical analysis for these enzymes. Immunopositivity of the enzymes were classified into scores as absent, present or strongly present. **Results and Conclusion:** The average radiographic area was 284.17 mm², 235.81 mm² and 381.81 mm², respectively. Immunopositivity of the enzymes was classified with scores. Statistical analyses revealed no association between the immunoreactivity of MMPs and radiographic area of the lesions in all pathologies studied ($p > 0.05$), except for MMP-2 and radicular cysts ($p = 0.02$; $r_s = -0.659$), for which smaller lesions had increased immunostaining for this enzyme. The results demonstrate that quantities of MMP-2 and MMP-9 are especially involved with dentigerous and radicular cysts in expansion, whereas these enzymes seem to be related to the biological behavior of keratocystic odontogenic tumors, indicating invasion and cell proliferation. Moreover, there is an inverse association between MMP-2 and MMP-9 in keratocystic odontogenic tumors ($p = 0.03$; $r_s = -0.660$), indicating activity in different regions.

Key words: JAW CYSTS. METALLOPROTEINS. RADIOGRAPHIC.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODO.....	15
3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	15
3.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	15
3.3 PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO.....	16
3.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	17
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4. CORRELAÇÃO ENTRE A ÁREA RADIOGRÁFICA E A IMUNOLOCALIZAÇÃO DA MMP-2 E MMP-9 EM CISTOS RADICULARES, CISTOS DENTÍGEROS E TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS UNILOCULARES.....	19
5. CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICES.....	42
ANEXO.....	63

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

As lesões de morfologia cística constituem um distúrbio de desenvolvimento, inflamatório ou neoplásico que se apresentam como cavidades preenchidas, no seu lúmen, com material líquido ou semi-sólido, revestida por epitélio circundado por rico estroma conjuntivo formando uma cápsula (SHEAR, 1999). As lesões que apresentam esse padrão arquitetural constituem a forma mais comum de entidades patológicas que acometem a porção intraóssea da região buco-maxilo-facial (HIGH, ROBINSON e KLEIN, 1993). Do ponto de vista epidemiológico, as lesões que exibem estes padrões patológicos são os cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos ceratocísticos, respectivamente (NEVILLE, DAMM e BOUQUOT, 2004).

A exata patogênese para cada uma dessas lesões ainda permanece desconhecida, contudo algumas teorias são especuladas e podem indicar uma possível gênese para estas entidades patológicas (AIMES e QUIGLEY, 1995; BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005; LIAPATAS, NAKOU e RONTOGIANNI, 2003; MAURETTE, JORGE e MORAES, 2006). Um exemplo é a classificação da Organização Mundial da Saúde, que apesar do padrão arquitetural semelhante dos cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos, disponibiliza uma categoria distinta para cada uma das lesões, baseada, principalmente, em seu comportamento biológico (BARNES *et al.*, 2005).

Neste sentido, Shafer, Hine e Levy (1983) e Shear (1985) indicaram que os cistos dentígeros derivam de alterações degenerativas no epitélio reduzido do órgão do esmalte associado ao acúmulo de líquido entre a coroa dentária e a linha do epitélio cístico tendo sido considerado como um cisto de desenvolvimento. Ziccardi, Eggleston e Schneider (1997) complementaram que a expansão cística estava associada com o aumento da pressão osmótica luminal, resultando na diapedese de células inflamatórias e células do epitélio para o lúmen cístico. Já Kubota *et al.* (2004) relataram que a pressão osmótica do fluído intracavitário é considerada alta (aproximadamente 80 mmHg) nos estágios de expansão e crescimento do cisto dentígero. Os autores indicaram que essa pressão está, também, associada à presença de proteínas que possuem finalidade anabólica e catabólica, as quais

parecem estar relacionadas não só à patogênese do cisto dentígero, mas também, à sua evolução.

Radiograficamente, o cisto dentígero apresenta-se como uma lesão radiolúcida unilocular que envolve e circunda a coroa de um dente incluso. Comumente, essa área radiolúcida é bem definida e, muitas vezes, há uma margem esclerótica pericística (NEVILLE, DAMM e BOUQUOT, 2004).

Os cistos radiculares são classificados como uma lesão de origem odontogênica e inflamatória. Constituem as lesões císticas de maior acometimento do complexo buco-maxilo-facial. Na sua gênese, estes cistos são associados a uma condição inflamatória de origem endodôntica. Após a necrose pulpar, disseminações microbianas ocorrem e estimulam o mecanismo flogístico, representado por alterações vasculares e migrações celulares inflamatórias no foco de injúria (MARTON e KISS, 2000). Estas células produzem inúmeros fatores de crescimento que contribuem para a proliferação de restos epiteliais de Malassez, que comumente se encontram nas adjacências das áreas radiculares, contribuindo, assim, para o desenvolvimento do cisto radicular (BENN e ALTINI, 1996).

Radiograficamente a maioria dos cistos radiculares apresentam-se como lesões radiolúcidas uniloculares que envolvem a região periapical de um dente. Sua expansão pode proporcionar mudanças de posições dentárias ou até mesmo reabsorções em dentes adjacentes (SCHOLL *et al.*, 1999). Embora essas lesões possuam características histopatológicas próprias, pouco se sabe sobre o mecanismo de seu crescimento. O diagnóstico histopatológico é de fácil reconhecimento, uma vez que essas lesões, além de apresentarem um infiltrado inflamatório predominantemente linfoplasmocitário na região capsular, também exibem presença de um epitélio proliferativo formado por áreas de projeções em arcos, em direção ao tecido conjuntivo adjacente (SHEAR, 1999).

Os tumores odontogênicos ceratocísticos são neoplasmas císticos e benignos originários do remanescente da lâmina dental (KOLAR *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009). Radiograficamente, os tumores odontogênicos ceratocísticos apresentam área radiolúcida bem evidenciada, apresentando cortical marginal definida. Os aspectos radiográficos não são suficientes para o diagnóstico final, pois os tumores odontogênicos ceratocísticos podem mimetizar um cisto dentígero, um cisto radicular ou um cisto residual (NEVILLE, DAMM e BOUQUOT, 2004).

Os tumores odontogênicos ceratocísticos possuem potencial de destruição local e tendência para a multiplicidade, levando a uma alta recidiva, devido sua ação proliferativa (BARNES *et al.*, 2005). Oliveira e colaboradores (2004) demonstraram a importância do potencial de proliferação e expansão das lesões de padrão cístico, e consequentemente, a osteólise.

Nesse contexto, as metaloproteinases da matriz (MMPs) possuem um papel importante em diversas condições fisiológicas e patológicas, que inclui a remodelação tecidual bem como a invasão celular (ALI, 2008). As MMPs constituem um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal. São enzimas zinco dependentes secretadas na forma latente (zimogênios). Tornam-se ativas no ambiente intersticial por segmentação de uma parte do zimogênio denominada de pró-peptídeo, isto é, pela quebra de uma ligação de cisteína e Zn^{++} (NAVARRO *et al.*, 2006). Em condições fisiológicas, as atividades das MMPs são de remodelação tecidual, regulação de transcrições, ativação de zimogênios, interações específicas com componentes da MEC e bloqueadores de inibidores naturais de MMPs (NAGASE e WOESSNER, 1999; STERNLICHT e WERB, 2001). A perda do controle da atividade dessas enzimas pode resultar em condições patológicas.

As MMPs foram primeiramente descritas por Gross e Lapière (1962). Esses autores observaram a atividade enzimática na degradação da tripla hélice do colágeno durante o fenômeno da metamorfose da cauda do girino. Assim, essa enzima foi denominada de collagenase intersticial, e posteriormente denominada de MMP-1. Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de elucidar e aprimorar os conhecimentos sobre as MMPs e seu mecanismo funcional (TERONEN *et al.*, 1995; TERONEN, 1998; WAHLGREN *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2007). Já foram descobertos 28 diferentes tipos de MMPs. São classificadas em seis grupos distintos de acordo com a especificidade do seu substrato e sua estrutura (NAVARRO *et al.*, 2006). Esses grupos são as collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, tipo membrana e outros (VISSE e NAGASE, 2003).

As gelatinases constituem um grupo representado pela MMP-2 e MMP-9. Estas são enzimas que possuem três repetições de um domínio de fibronectina II, inserida no domínio catalítico. A presença dos domínios de fibronectina são importantes uma vez que estão associados à lise de colágenos, especialmente o do tipo IV, gelatina e elastina (TREXLER *et al.*, 2003). Em revisão de literatura clássica,

Visse e Nagase (2003) enumeraram as principais atividades das MMPs. Funcionalmente, a MMP-2 está associada com diferenciação de células mesênquimais hematopoiéticas em células inflamatórias bem como sua regulação, migração e proliferação de células epiteliais, além do aumento da biodisponibilidade do fator de crescimento da insulina-1 (IGF-1) e do fator de crescimento transformante- β (TGF- β). Já a MMP-9 é relacionada com a geração de fragmentos de angiostatina, afinidade ao colágeno, ação pró-inflamatória e inflamatória e redução da resposta da interleucina-2 (IL-2). Todos esses processos biológicos mencionados podem influenciar o desenvolvimento e comportamento biológico de quaisquer entidades patológicas, inclusive das lesões uniloculares de natureza odontogênica com padrão arquitetural cístico.

Teronen (1998) mostrou que a presença da MMP-2 e da MMP-9 em extratos teciduais de cistos, em especial a forma ativa da MMP-2, pode desencadear uma atividade proteolítica significativa, levando a um papel ativador na expansão cística.

Pinheiro (2002), por meio de técnicas de imunoistoquímica e zimografia, avaliou a expressão das MMPs-1, -2 e -9 em ameloblastomas. Evidenciou que tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 estavam presentes na sua forma ativa e inativa, simultaneamente. O autor indicou que as MMPs presentes no ameloblastoma podem desempenhar um papel importante no processo de invasão local dessa neoplasia.

Egeblad e Werb (2002) identificaram intensa expressão de MMPs em diversas neoplasias malignas epiteliais (carcinomas), associando a presença dessas enzimas com a gênese patológica, modulação da proliferação, angiogênese, invasão tumoral e consequentemente metástases. Os autores demonstraram que a proteinase que está intimamente envolvida aos comportamentos carcinomatosos descritos acima é a MMP-2. Sugere também que uma contribuição importante da enzima MMP-2 nestes processos está relacionada em sua capacidade de hidrolisar o colágeno do tipo IV, principal componente das membranas basais justaepitelial e peri-vascular, iniciando, assim, o processo de invasão neoplásica.

Meghji *et al.* (1992) e Teronen *et al.* (1995) determinaram que os níveis de interleucina-1 α (IL-1 α) são significativamente maiores nos fluídos císticos dos tumores odontogênicos ceratocísticos quando comparados com os cistos dentígeros

e os cistos radiculares. Oka *et al.* (2005) avaliaram o efeito da pressão intracística em tumores odontogênicos ceratocísticos e correlacionaram com os efeitos do fluido através da expressão da IL-1 α , MMPs e prostaglandinas a fim de estabelecer se as citocinas do processo inflamatório poderiam ou não sinalizar os eventos osteoclásticos. Os resultados deste trabalho demonstraram que a pressão do fluido intracístico é regulado pela IL-1 α produzida por células epiteliais. A presença da IL-1 α é responsável pelo estímulo e secreção de MMP-1, MMP-2, MMP-3, fato relacionado com a reabsorção óssea e conseqüentemente com o crescimento dos tumores odontogênicos ceratocísticos.

Silveira *et al.* (2007) realizaram avaliação da expressão imunoistoquímica das MMPs -1, -2 e -9, tanto no epitélio quanto no mesênquima de 15 cistos radiculares, 10 cistos radiculares residuais, 10 cistos dentígeros e 10 tumores odontogênicos ceratocísticos. Os resultados indicaram que o crescimento dessas lesões pode ser influenciado pela secreção das MMPs. A imunoexpressão mais exuberante das MMPs ocorreu no mesênquima dos tumores odontogênicos ceratocísticos confirmando sua participação ativa no crescimento da lesão, o que pode justificar, em parte, sua maior agressividade em relação às outras lesões císticas.

Em carcinomas basocelulares, Ribeiro *et al.* (2008) avaliaram a imunoexpressão da MMP-2 e MMP-9 e seus inibidores teciduais correlacionando esses achados com variáveis clínicopatológicas da lesão, representadas por idade e tamanho. Observou-se correlação significativa entre idade e tamanho da lesão ($R=0,532$; $p=0,008$). Contudo, não foram observadas correlações entre as outras variáveis e a expressão imunoistoquímica dos antígenos de interesse. Concluíram que a expressão das MMPs e de seus inibidores teciduais não parecem influenciar o tamanho das lesões estudadas.

Ribeiro *et al.* (2009) compararam a expressão das MMP-1, -2 e -9 em estroma e parênquima de ameloblastomas e tumores odontogênicos adenomatóides. Afirmaram que as MMPs estão relacionadas ao crescimento e a progressão dos tumores analisados, e, particularmente, no ameloblastoma, a alta agressividade, pode ser explicada, em parte, pela grande quantidade de imunomarcagem positiva dessas enzimas no estroma.

2. OBJETIVO

Correlacionar a área radiográfica de lesões uniloculares com a imunolocalização da MMP-2 e MMP-9 em cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados espécimes histológicos de pacientes submetidos à biópsia incisional ou excisional na disciplina de Diagnóstico Bucal da Universidade Federal do Paraná, entre os anos de 2005 a 2009, e que tiveram seus diagnósticos confirmados de cistos dentígeros, cistos radiculares ou tumores odontogênicos ceratocísticos. Além do material histopatológico, a presença de radiografias panorâmicas realizadas na Instituição também fez parte dos critérios de inclusão. Todos os espécimes de tumores odontogênicos ceratocísticos contidos nesta pesquisa apresentaram aspecto radiográfico unilocular. Foram excluídos da amostra espécimes muito pequenos que impossibilitaram a realização do processamento imunoistoquímico.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (Apêndice 1: CAAE 00350091000-09).

3.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As radiografias panorâmicas da amostra foram obtidas no aparelho radiológico modelo Ortophos® (Siemens AG, Berlim, Alemanha), no Serviço de Radiologia Odontológica, da Universidade Federal do Paraná. A interpretação radiográfica foi realizada por um examinador previamente calibrado, em ambiente escurecido e com negatoscópio apropriado. Os dados foram coletados em três momentos distintos, com intervalo de quinze dias. Todas as lesões analisadas apresentavam aspecto radiográfico unilocular e elíptico.

Primeiro, identificou-se a localização da lesão: região de incisivos e caninos, região de pré-molares e região de molares, a fim diminuir, posteriormente, o índice de magnificação da imagem para cada região. O tamanho de cada lesão foi calculado, baseando-se em seus eixos.

Utilizou-se a medida do maior comprimento e maior altura da área da lesão, em milímetros, por meio de um paquímetro digital. As medidas, tanto para altura quanto para comprimento, foram registradas em ficha própria, tabuladas e submetidas à análise estatística, por meio do coeficiente de correlação intraclasse, com um intervalo de confiança de 95%.

Após este cálculo, foi realizada a média aritmética dos três valores obtidos para a altura e para o comprimento de cada lesão. O índice de magnificação da imagem radiográfica foi subtraído do valor encontrado inicialmente.

Para obtenção do índice de magnificação da imagem foram utilizadas três radiografias panorâmicas e três modelos de gesso de estudo do mesmo paciente, do arquivo de documentações da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia-Buco-Maxilo-Faciais II. Foi realizada a medida de cada dente, tanto na radiografia panorâmica quanto no modelo de estudo, por meio de paquímetro digital. A partir dos dados obtidos, foi calculado o percentual de magnificação para cada dente e realizada a média entre os mesmos.

A magnificação da imagem para a região dos incisivos e caninos foi de 13,67%. Para a região de pré-molares e molares, o valor foi de 25,92% e 23,48%, respectivamente. A partir da subtração do valor de magnificação, obteve-se uma medida para a altura e para o comprimento, o mais semelhante das imagens bidimensionais. Para o cálculo da área da lesão, em mm^2 , foi utilizada fórmula matemática [Área da elipse = $\pi \times \text{raio } 1(\text{eixo}/2) \times \text{raio } 2(\text{eixo}/2)$].

3.3 PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Os blocos de parafina contendo os espécimes foram submetidos a cortes teciduais seriados de $3\mu\text{m}$, em um Micrótomo Slee Cut 5062® (Slee Mainz, Mainz, Alemanha). Os cortes foram imersos em banho histológico, estendidos em lâminas de vidro silanizadas e submetidos à secagem, por 24 horas, a 37°C , em estufa. Os

espécimes foram desparafinizados em 02 banhos de xilol e submetidos a hidratação gradativa em cadeia descendente de álcool. Foi realizada a recuperação antigênica em solução de tripsina - 1N (pH 7,2) por 60 minutos, a 37°C a fim de quebrar as ligações cruzadas de formol e recuperar as proteínas (antígenos). As lâminas contendo os espécimes histológicos foram imersas em peroxidase de hidrogênio, a 3%, durante 30 minutos, a fim de remover a atividade da peroxidase endógena, seguido pela incubação em solução sódio fosfato, a 1% (PBS, pH 7,4.) Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-MMP2 (NCL – MMP-2 – 507 – Mouse Monoclonal - Novocastra® – Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) e anti-MMP9 (NCL-MMP-9-439 – Mouse Monoclonal – Novocastra® – Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK), ambos com o fator de diluição de 1:20, por 18 horas, a 4°C. Na sequência, os cortes foram incubados com a solução de anticorpo secundário (AdvanceTM HRP Label – Link e Enzyme - K4068 - Dako® - Glostrup/Germany), por 40 minutos, em temperatura ambiente, a fim de detectar o anticorpo primário. As reações foram reveladas com 3´3 tetraclorido de diaminobenzidina (Sigma, St Louis, USA), por 03 minutos, resultando em uma coloração acastanhada no local do antígeno. Os espécimes foram contracolorados com a solução de hematoxilina de Harris. Foi realizada a montagem final da lâmina. Para cada espécime, três cortes foram utilizados para incubação com cada anticorpo.

3.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A imunolocalização da MMP-2 e da MMP-9 foi analisada do ponto de vista qualitativo (descritivo) e quantitativo. Todos os espécimes foram examinados em microscópio de luz utilizando um aumento de 40x e de 100x. Dois avaliadores analisaram a imunolocalização dessas enzimas, caracterizando-as de acordo com Kumamoto *et al.* (2003) como (-) negativo, quando não houve imunomarcacão, (+) positivo, quando houve imunomarcacão em menos de 10% da lâmina e (++) fortemente positivo, quando houve imunomarcacão em mais de 10% da lâmina.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística. Os cálculos foram realizados utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences®, Versão 15.0, Chicago, EUA). Foram correlacionadas às variáveis de imuno-marcação (variável ordinal) com a área radiográfica da lesão (variável numérica), através do Coeficiente de Correlação de Spearman, com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. CORRELAÇÃO ENTRE A ÁREA RADIOGRÁFICA E A IMUNOLOCALIZAÇÃO DA MMP-2 E MMP-9 EM CISTOS DENTÍGEROS, CISTOS RADICULARES E TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS UNILOCLARES

Título: Correlação entre a área radiográfica e imunolocalização da MMP-2 e MMP-9 em cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos uniloculares.

Título resumido: Associação da imunoexpressão da MMP-2 e MMP-9 em lesões com aspecto radiográfico unilocular

Nome dos autores:

Rafaela SCARIOT de Moraes

Allan Fernando GIOVANINI*

Nelson Luis Barbosa REBELLATO

Renato Cordeiro GUGISCH

Instituição:

Universidade Federal do Paraná/Curso de Odontologia

Departamento de Estomatologia

Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico

CEP: 80210-170 Curitiba/PR – Brasil

* Universidade Positivo/Curso de Odontologia

Autor correspondente:

Rafaela Scariot de Moraes

Rua Dr. Brasília Vicente de Castro, 320 Ap 403 – Campo Comprido

CEP: 81200-340 Curitiba, PR, Brasil

Fone: 055 41 32859394

E-mail: rafaela_scariot@yahoo.com.br

Não há agências financiadoras para a pesquisa em questão.

Palavras chave: Cistos Maxilomandibulares; Metaloproteínas; Radiografia.

Resumo

As lesões císticas uniloculares intraósseas são as entidades patológicas mais comuns que afetam a região buco-maxilo-facial. O potencial proliferativo bem como a sua expansão ainda são incertos. Sugere-se que as metaloproteinases (MMPs) têm um papel importante no desenvolvimento de algumas condições patológicas. O objetivo desse estudo foi correlacionar os aspectos radiográficos (área) da lesão com a presença das MMPs-2 e -9 nos cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos. A amostra foi composta por dez espécimes de cistos dentígeros, nove cistos radiculares e oito tumores odontogênicos. A área radiográfica de cada lesão foi calculada a partir da fórmula matemática da área da elipse. Todos os espécimes foram submetidos à análise imunoistoquímica para estas enzimas. As imunolocalizações das MMPs-2 e -9 foram classificadas em escores, como ausente, presente ou fortemente presente. A média das áreas radiográficas das lesões foi de 284,17 mm² para os cistos dentígeros, 235,81 mm² para os cistos radiculares e 381,81 mm² para os tumores odontogênicos. O resultado das análises estatísticas mostraram que a imunolocalização das MMPs e a área radiográfica das lesões não estão relacionadas para todas as lesões em questão ($p>0,05$), exceto para a MMP-2 nos cistos radiculares ($p=0,02/r_s=-0,659$), o que significa que quanto menor o cisto radicular maior a imunomarcação para essa enzima. A MMP-2 e a MMP-9 estão envolvidas com os cistos dentígeros e radiculares, relacionando-os com a expansão cística enquanto a MMP-2 e a MMP-9, nos tumores odontogênicos ceratocísticos, estão relacionadas a invasão, proliferação celular e consequentemente agressividade. Além disso, há uma associação inversa, nesse tumor, entre a imunomarcação da MMP-2 e MMP-9 ($p=0,03/r_s=-0,660$), indicando imunoexpressões em regiões distintas.

Introdução

As lesões císticas constituem distúrbios de desenvolvimento, inflamatório ou neoplásico que se apresentam como cavidades preenchidas no seu lúmen por material líquido ou semi-sólido, revestida por epitélio circundado por um rico estroma conjuntivo formando uma cápsula¹⁴. As lesões que apresentam esse padrão

arquitetural constituem a forma mais comum de entidades patológicas intraósseas que acometem a região buco-maxilo-facial⁶. Do ponto de vista epidemiológico, as lesões mais frequentes que exibem estes padrões são os cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos ceratocísticos, respectivamente¹⁵.

Alguns estudos^{11,12,15} demonstraram a importância do potencial de proliferação e expansão destas entidades e, conseqüentemente, a osteólise. Esses fatores geralmente estão associados a síntese de proteínas ou enzimas que alteram a homeostase do epitélio cístico e da matriz extracelular (MEC) em especial nos tumores odontogênicos ceratocísticos¹². Nesse contexto destacam-se as metaloproteinases (MMPs).

As MMPs são enzimas proteolíticas zinco dependentes, secretadas pelas células epiteliais e conjuntivas, que exercem um papel importante em diversas condições fisiológicas e patológicas, como a remodelação tecidual e invasão celular^{2,3,5}. As MMPs são classificados de acordo com a sua estrutura e especificidade de seus substratos. A MMP-2 (72kDa) e MMP-9 (92kDa) são gelatinases e desempenham um papel específico na degradação da MEC. Estas enzimas contêm três repetições de um domínio de fibronectina II em seu domínio catalítico, o que as auxilia na degradação do colágeno tipo IV, de gelatinas e elastina¹⁷.

Assim as MMPs-2 e -9 são relacionadas a processos fisiológicos como a diferenciação e proliferação celular, afinidade celular, reforço da atividade colagenolítica, migração celular, redução da resposta da IL-2 e outros¹⁷. Quando em desequilíbrio, as MMPs podem influenciar no comportamento biológico de qualquer entidade patológica.

O objetivo desse estudo foi correlacionar os aspectos radiográficos de lesões uniloculares com a imunolocalização da MMPs-2 e -9 nos cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos.

Materiais e Métodos

Seleção da amostra: Foram selecionados espécimes histológicos de pacientes submetidos à biópsia em uma Instituição de Ensino Superior, entre os anos de 2005 a 2009, e que tiveram seus diagnósticos confirmados de cistos

dentígeros, cistos radiculares ou tumores odontogênicos ceratocísticos. Além do material histopatológico, a presença de radiografias panorâmicas realizadas na Instituição também fez parte dos critérios de inclusão. Foram excluídos da amostra espécimes histológicos muito pequenos que impossibilitaram a realização do processamento imunoistoquímico. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CAAE 00350091000-09).

Análise radiográfica: Todas as radiografias panorâmicas analisadas foram realizadas no aparelho radiológico extrabucal modelo Ortophos CD® (Siemens AG, Berlim, Alemanha), do Serviço de Radiologia Odontológica da Instituição. Todas as entidades patológicas analisadas eram uniloculares foi mensurada a área de cada lesão. Para tanto, foi realizada a medida dos eixos principais (eixo1 = altura e eixo2 = comprimento), em milímetros, por meio de um paquímetro metálico digital. Essas medidas correspondem aos eixos da lesão, considerando que as mesmas tinham a forma elíptica. A interpretação radiográfica de cada lesão foi realizada em três momentos distintos, com intervalos de quinze dias, por um mesmo examinador, em ambiente escurecido e com negatoscópio apropriado. As medidas obtidas em cada eixo foram registradas em ficha própria, tabuladas e avaliadas estatisticamente quanto a sua confiabilidade, através do coeficiente de correlação intraclasse com um intervalo de confiança de 95%. Após essa etapa, foi realizada a média de cada um dos valores dos eixos encontrados e subtraídas do valor pré-estabelecido de magnificação da imagem da radiografia panorâmica para cada região analisada, a fim de se obter a medida real da lesão em duas dimensões. Assim, foi calculada a área de cada lesão, em mm^2 , através de fórmula matemática [Área de elipse: $\pi \times \text{raio1}(\text{eixo1}/2) \times \text{raio 2}(\text{eixo2}/2)$].

Processamento imunoistoquímico: Cortes teciduais seriados de $3\mu\text{m}$ foram desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica em solução de tripsina - 1N (pH 7,2) por 60 minutos, a 37°C . As lâminas contendo os cortes histológicos foram imersas em peroxidase de hidrogênio, durante 30 minutos, a fim de remover a atividade da peroxidase endógena, seguido pela incubação em solução sódio fosfato, a 1% (PBS, pH 7,4.) Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-MMP2 (NCL – MMP-2 – 507 – Mouse Monoclonal - Novocastra® – Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) e anti-MMP9 (NCL-MMP-9-439 – Mouse Monoclonal

– Novocastra® – Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK), ambos com o fator de diluição de 1:20, por 18 horas. Na sequência, os cortes foram incubados com a solução de anticorpo secundário (Advance™ HRP Label – Link e Enzyme - K4068 - Dako® - Glostrup/Germany), a fim de detectar o anticorpo primário. As reações foram reveladas com 3´3 tetraclorido de diaminobenzidina (Sigma, St Louis/USA), por 03 minutos, resultando em uma coloração acastanhada no local do antígeno. Os cortes foram contra-corados com a solução de hematoxilina de Harris. Para cada espécime, três cortes foram utilizados para incubação com cada anticorpo.

Análise imunoistoquímica: A imuno-marcação da MMP-2 e da MMP-9 foram analisadas do ponto de vista qualitativo (descritivo) e quantitativo. Todos os cortes foram examinados em microscópio de luz utilizando um aumento de 40x e de 100x. Dois avaliadores analisaram a presença ou ausência de imuno-marcação para as enzimas, caracterizando-as de acordo com KUMAMOTO *et al.*⁷ como (-) negativo, (+) positivo e (++) fortemente positivo.

Análise estatística: Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística. Os cálculos foram realizados utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences®, Versão 15.0, Chicago, EUA). Foram associadas às variáveis de imuno-marcação e tamanho da lesão, através do Coeficiente de Correlação de Spearman, com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Seguindo os critérios de elegibilidade, a amostra foi composta por 10 cistos dentígeros, 9 cistos radiculares e 8 tumores odontogênicos ceratocísticos.

Análise Radiográfica

Todas as lesões analisadas apresentaram aspecto radiográfico unilocular. Foi realizada a média dos eixos das lesões, em mm (eixo1 e eixo2). O coeficiente de correlação intraclasse para cada lesão foi mensurado, mostrando-se eficiente para as medidas apresentadas. A magnificação da imagem foi de 13,67% para a região de incisivos e caninos. Para os pré-molares e molares foi de 25,92% e 23,48%,

respectivamente. As médias das áreas foram de 284,17mm², 235,81mm² e 381,81mm², respectivamente (Tabela 1).

Análise imunoistoquímica

A análise qualitativa dos dados qualitativos é descrita abaixo. Os resultados quantitativos são mostrados nas tabelas 2 e 3.

MMP-2: A presença de MMP-2 foi identificada principalmente no epitélio cístico e na borda da cápsula, adjacente ao tecido ósseo remanescente tanto para cisto dentífero quanto para cisto radicular (Fig. 1A, 1B, 1C). No cisto radicular, além da região de borda óssea, observou-se também a imunomarcção da MMP-2 coincidente em áreas de processo inflamatório crônico, bem como em regiões de projeções epiteliais em arcos (Fig.1D). Diferentemente, o tumor odontogênico ceratocístico exibiu imunopositividade para a MMP-2 principalmente em lâmina basal quando ocorria a perda da interação entre os tecidos epiteliais e o conjuntivo (Fig. 1E e 1F).

MMP-9: A imunolocalização da MMP-9 para o cisto dentífero e para o cisto radicular apresentou-se semelhante, ocorrendo principalmente em epitélio e esparsadas de forma aleatória na cápsula cística (Fig. 2A, 2B, 2C). Nos cistos radiculares observou-se maior imunomarcção em áreas inflamatórias (Fig. 2D). Já os tumores odontogênicos ceratocísticos demonstraram áreas amplas e fortemente imunomarcadas, tanto em epitélio quanto em cápsula (Fig. 2E e 2F).

Correlação entre imunolocalização das MMPs-2 e -9 e a área radiográfica das entidades patológicas: Os resultados apresentados aqui evidenciam que não houve correlação entre a imunolocalização e a área radiográfica das lesões, exceto uma correlação inversa entre a presença da MMP-2 e o cisto radicular ($p=0,02/r_s=-0,659$), o que significa que quanto menor o cisto radicular encontrado, maior era o padrão de imunoexpressão desta enzima e vice-versa. Além disso, as amostras de todas as lesões foram divididas em dois grupos a partir da média das lesões encontradas neste trabalho: maiores que 200 mm² e menores que 200 mm². Para as lesões menores que 200 mm² e diagnosticadas como cisto radicular e cisto dentífero observou-se uma relação inversa entre o tamanho das lesões e as imunomarcações tanto da MMP-2 e MMP-9 ($p=0,013/r_s=-0,593$). Um outro fato importante é a ocorrência da associação inversa entre a MMP-2 e a MMP-9 ($p=0,03/r_s=-0,660$) somente nos tumores odontogênicos ceratocísticos.

Discussão

As entidades císticas representam lesões de desenvolvimento, inflamatórias e neoplásicas que são compostas por um tecido epitelial que circunda uma cavidade contígua a uma cápsula composta por tecido conjuntivo denso¹⁴. Embora apresentem microarquitetura similar, significantes diferenças epidemiológicas e biológicas comportamentais são encontradas entre elas.

Na análise radiográfica, todas as imagens das lesões estudadas demonstraram aspecto unilocular associadas com halo esclerótico pericístico, sendo esse último achado constante somente para os cistos dentígeros e radiculares. A área média encontrada foi diferente entre as entidades patológicas. Neste trabalho os tumores odontogênicos ceratocísticos apresentaram médias superiores aos outros cistos estudados (381,81 mm²), o que é consistente com a literatura¹⁰. Já as médias encontradas para o cisto dentígero e o cisto radicular foram de 284,17 mm² e 235,81 mm², respectivamente.

Apesar das médias dos cistos dentígeros e dos cistos radiculares apresentarem-se maiores que 200 mm², 13 desses cistos (68,42%) demonstraram áreas menores que 200 mm². Nestes cistos, uma correlação inversa entre a área da lesão e a imunopositividade, tanto de MMP-2 quanto de MMP-9, foi observada. Isso significa que quanto menor a área radiográfica dos cistos dentígeros e dos cistos radiculares, maior a imunexpressão dessas enzimas. Sendo assim, esses dados sugerem que em fases iniciais do desenvolvimento desses cistos há uma atividade enzimática maior, proporcionando uma maior degradação dos componentes da MEC.

Em todos os espécimes de cistos dentígeros e cistos radiculares menores de 200 mm², os resultados indicaram que a presença da MMP-2 foi intensa e coincidente com as bordas adjacentes ao tecido ósseo. Esses resultados corroboram com outros autores^{1,4} que descreveram a importância desta enzima no processo de expansão cística. Nos estágios iniciais da lesão, a MMP-2 não só digere de forma mais lenta o colágeno I desnaturado, mas também pode ser responsável pela indução da formação da borda esclerótica dos cistos radiculares e dentígeros. Essa hipótese é suportada pelos achados de SAKAMOTO *et al.*¹³ que demonstraram a presença de calcificação associada a uma maior quantidade de MMP-2, sugerindo uma associação direta entre a deposição de cálcio e a degradação da MEC. Marcadores

específicos para linhagem óssea são ausentes neste processo, o que condiz que a calcificação associada a MMP-2 não é secundária à ossificação, e sim a uma deposição de cálcio de forma patológica. Nos 6 cistos dentígeros e radiculares que apresentaram valores de área acima de 200 mm² este fenômeno também ocorreu.

Os escores para a imunoexpressão da MMP-2 nos cistos dentígeros apresentaram-se maiores que nos cistos radiculares.

Com relação a imunomarcação da MMP-2 e do cisto radicular, houve uma prevalência dessa enzima no mesênquima, associada principalmente as células inflamatórias e a áreas coincidentes com a formação de projeção em arcos do tecido epitelial. Estatisticamente, houve uma correlação inversa entre o tamanho da lesão e a imuno-marcação nesse cisto, o que pode significar que em lesões iniciais de origem endodôntica, o processo inflamatório é maior do que em lesões maduras. Sugere-se que a MMP-2, no cisto radicular, desencadeie uma cadeia de eventos osteolíticos, estimulados inicialmente pelas células do processo inflamatório. Também para os cistos dentígeros e radiculares, foi encontrada a presença da MMP-9 em grande parte da cápsula cística relacionando essa enzima novamente com a expansão.

Nos tumores odontogênicos ceratocísticos, observou-se intensa expressão da MMP-2 e da MMP-9 tanto no epitélio quanto no mesênquima. Embora os tumores odontogênicos ceratocísticos apresentem um escore para imunomarcação semelhante ao dos cistos dentígeros, a localização da MMP-2 é diferente para essa entidade patológica. Observou-se que a presença desta enzima ocorreu em toda cápsula conjuntiva, indicando uma maior ação osteolítica da cápsula tumoral quando comparada a cistos de desenvolvimento.

Um estudo que pode ajudar no entendimento deste resultado é a presença de IL-1 α no fluido cístico dos tumores odontogênicos ceratocísticos. Em estudos prévios, de MEGHI et al.⁸ e de TERONEN et al.¹⁶ foram determinados que os níveis de IL-1 α são significativamente maiores no fluido cístico dos tumores odontogênicos ceratocísticos quando comparados com outras entidades patológicas. OKA et al.¹¹ demonstraram que a pressão positiva do fluido induziu a reabsorção de osso nos tumores odontogênicos ceratocísticos, uma vez que o aumento da expressão da IL-

1 α induz a secreção da MMP-1, MMP-2 e MMP-3, responsáveis pela reabsorção óssea.

Além disso, sabe-se que a MMP-2 tem afinidade pela laminina¹⁸ e pelo colágeno tipo IV, que são os principais constituintes da lâmina basal. Isso indica que a MMP-2 pode estar relacionada com a quebra da lâmina basal induzindo o processo de invasão tumoral do epitélio para a formação dos cistos filhotes ou satélites. Este fato parece ocorrer nos espécimes deste estudo uma vez que se observou marcação para a MMP-2 na região de lâmina basal do epitélio cístico principal e em áreas sugestivas de cistos filhotes.

Um fato interessante do trabalho foi que regiões que possuíam imunomarcação para a MMP-2 não apresentavam expressão da MMP-9, sugerindo que a MMP-2 exerce um papel diferente da MMP-9, apesar da sua conformação estrutural semelhante e do seu poder regulatório sobre a MMP-9, fato que a torna inativa. Nos espécimes de tumores odontogênicos ceratocísticos estudados aqui, pode-se sugerir que a presença intensa da MMP-9 se dá pela ineficiência regulatória da MMP-2, semelhantemente as alterações neoplásicas⁹.

Embora a MMP-9 seja imunoexpressa em áreas diferentes da MMP-2, a MMP-9 foi mais intensa nos tumores odontogênicos ceratocísticos que a MMP-2, indicando que a presença da MMP-9, não só está relacionada com a expansão cística, mas com a agressividade da lesão. SILVEIRA *et al.*¹⁵ mostraram que a forte presença da MMP-9 nos componentes mesênquimais dos tumores odontogênicos ceratocísticos, pode explicar o seu comportamento mais agressivo.

Em resumo, as MMPs não estão associadas com o tamanho da lesão, exceto para o cisto radicular e a MMP-2. A MMP-2 e a MMP-9 parecem estar relacionadas com a expansão cística, nos cistos dentígeros e radiculares. Para essas entidades patológicas é possível afirmar que as lesões menores estão associadas com maior degradação óssea. Já nos tumores odontogênicos ceratocísticos a MMP-2 e a MMP-9 trabalham em regiões distintas, sugerindo que a MMP-2 quebra a lâmina basal, permitindo a invasão tumoral e a MMP-9 estimula a proliferação e migração celular, determinando a agressividade desta entidade patológica.

Agradecimento

Gostaríamos de agradecer a Prof^a. Dr^a. Fernanda de Moraes Ferreira pela ajuda nas análises estatísticas desse estudo.

Referências

1. Aimes RT, Quigley JQ. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1995; 270(11): 5872-76.
2. Ali MAA. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic cysts. *Med oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:258-63.
3. Aumailley M. Structure and supramolecular organization of basement membranes. *Kidney Int Suppl* 1995; 49: S4-7.
4. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration in invasion of cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1755: 37-69.
5. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-57.
6. High AS, Robinson PA, Klein CE. Discrimination of parakeratinized odontogenic keratocysts from other odontogenic and non-odontogenic cyst types by expression of a 38kd cell-surface glycoprotein. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 363-367.
7. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32:114-20.
8. Meghji S, Henderson B, Bando Y, Harris M. Interleukin-1: the principal osteolytic cytokine produces by keratocysts. *Archs Oral Biol* 1992; 37: 935-43.
9. Miyagi SPH, Hiraki KRN, Martins MD, Marques MM. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro. *J Oral Scienc*, 2008;50:2:187-92.
10. Neville BW, Damm DD, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 2th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
11. Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2005;84(10): 913-18.

- 12.Oliveira MDC, Miranda JL, Amorim RFB, Souza LB, Freitas RA. Tenascin and fibronectin expression in odontogenic cysts. J Oral Pathol Med 2004;33: 354-9.
- 13.Sakamoto A, Weinstein LS, Plagge A, Eckhaus M, Kelsey G. GNAS Haploinsufficiency Leads to Subcutaneous Tumor Formation With Collagen and Elastin Deposition and Calcification. Endoc Res 2009: 34: 1-2 :1-9.
- 14.Shear M. Cistos da região buco-maxilo-facial – Diagnóstico e Tratamento. 3 ed. São Paulo: Editora Santos, 1999.
- 15.Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RH. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. J Bras Patol Med Lab 2007: 43(3): 203-9.
- 16.Teronen O, Salo T, Konttinen YT, Rifkin B, Vernillo A, Ramamurthy NS, Kjeldsen I, Borregaard N, Hietanen J, Sorsa T. Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. J Oral Pathol Med 1995;24: 78-84.
- 17.Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissues Inhibitors of Metalloproteinases – Structure, function and biochemistry. Circ Res 2003: 92: 827-39.
- 18.Wahlgren J, Väänänen A, Teronen O, Sorsa T, Pirilä E, Hietanen J, Maisi P, Tjäderhane L, Salo T. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. J Oral Pathol Med 2003: 32(2): 100-7.

Tabela 1: Média inicial dos valores obtidos nos eixos 1 e 2, através das imagens da radiográfica panorâmica, em mm, de cada lesão do estudo. Média subtraída dos valores de magnificação da imagem, nos eixos 1 e 2, através das imagens da radiográfica panorâmica, em mm, de cada lesão do estudo.

<i>Entidades Patológicas</i>	<i>Média dos eixos 1 (mm)</i>	<i>Média dos eixos 2 (mm)</i>	<i>Média do eixo 1 subtraído da magnificação (mm)</i>	<i>Média do eixo 2 subtraído da magnificação (mm)</i>	<i>Área final da lesão (mm²)</i>
Cisto Dentígero	27,69	27,16	20,51	20,12	323,93
CCI: 0,991	17,86	21,34	13,66	16,32	175
	11,84	12,79	10,22	11,04	88,57
	14,59	17,64	12,59	15,22	150,30
	15,33	18,66	13,23	16,01	166,27
	13,56	23,63	11,70	20,39	187,27
	18,77	18,98	13,90	14,06	153,41
	48,65	47,26	41,99	40,79	1344,20
	22,18	15,89	16,97	12,15	161,76
	10,18	19,49	7,78	14,91	91,05
Cisto Radicular	35,08	24,42	30,28	21,08	501,06
CCI: 0,996	14,01	15,20	12,09	13,12	124,41
	12,49	12,97	10,78	11,19	94,69
	33,27	20,86	28,72	18,00	405,81
	23,69	15,88	20,45	13,70	219,82
	37,27	24,82	32,17	21,42	540,76
	12,03	20,79	10,38	17,94	146,18
	11,55	11,35	8,55	8,40	56,31
	10,44	6,95	7,98	5,31	33,26
Tumor Odontogênico	33,23	30,49	24,61	22,58	436,04
	21,31	17,37	18,39	14,99	216,28

Ceratocístico	35,15	34,86	26,91	26,67	563,17
CCI:0,987	19,28	18,85	16,64	16,27	212,52
	13,07	14,72	10,00	11,26	88,39
	43,14	26,47	33,01	20,25	524,57
	19,31	18,23	14,77	13,94	161,51
	48,45	40,84	35,89	30,25	852,01

CCI: Coeficiente de Correlação Intraclassa

Tabela 2: Descrição quantitativa dos dados encontrados para a imunomarcagem da MMP-2 nos cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos.

MMP-2						
	Cisto Dentígero		Cisto Radicular		Tumor Odontogênico Ceratocístico	
	N	(%)	n	(%)	n	(%)
-	2	20	4	44,4	3	37,5
+	5	50	3	33,3	2	25
++	3	30	2	22,3	3	37,5
Total	10	100%	9	100%	8	100%

Tabela 3: Descrição quantitativa dos dados encontrados para a imunomarcagem da MMP-9 nos cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos.

MMP-9						
	Cisto Dentígero		Cisto Radicular		Tumor Odontogênico Ceratocístico	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
-	4	40	1	11,2	1	12,5
+	4	40	4	44,4	1	12,5
++	2	20	4	44,,4	6	75
Total	10	100%	9	100%	8	100%

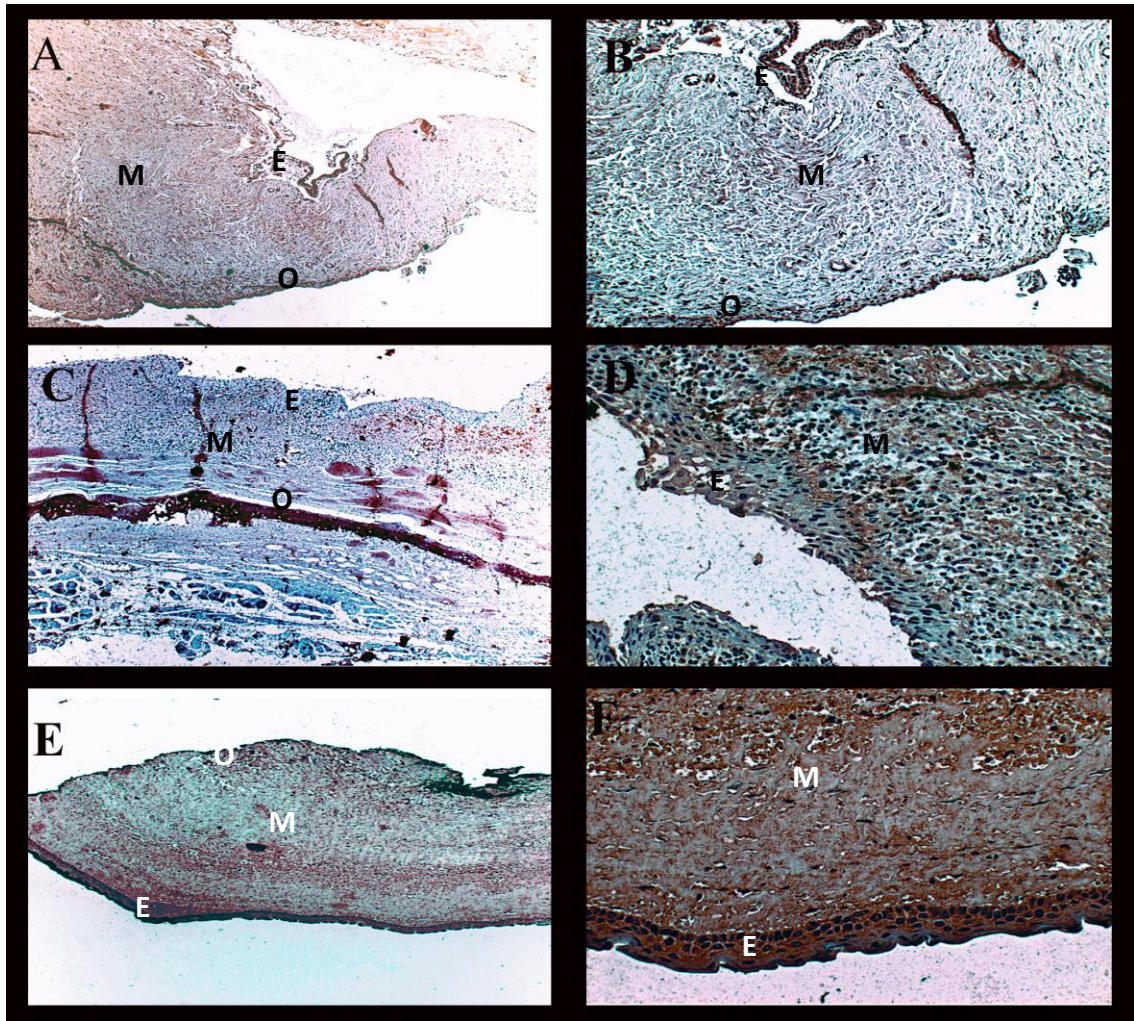


Figura 1: Prancha de lâminas histológicas com imunomarcagem para MMP-2 no cisto dentígero (A e B), cisto radicular (C e D) e tumor odontogênico ceratocístico (E e F), em 40x e 100x.

E: Epitélio

M: Mesênquima

O: Área tangenciando borda óssea

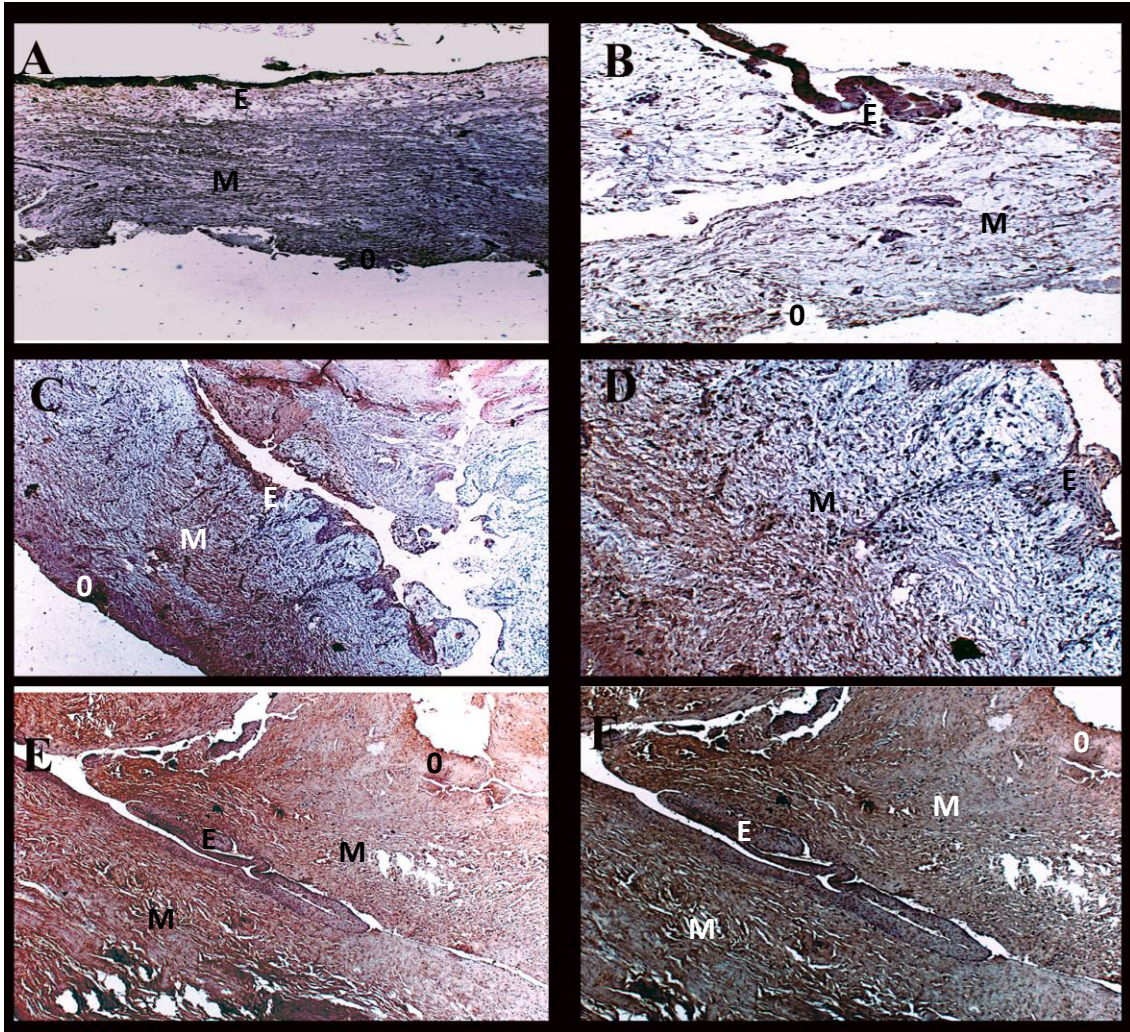


Figura 2: Prancha de lâminas histológicas com imunomarcagem para MMP-9 no cisto dentígero (A e B), cisto radicular (C e D) e tumor odontogênico ceratocístico (E e F), em 40x e 100x.

E: Epitélio

M: Mesênquima

O: Área tangenciando borda óssea

5. CONCLUSÕES

- a) Não houve correlação estatística entre a MMP-2 e a MMP-9 com a área radiográfica das lesões avaliadas, exceto pela MMP-2 em cistos radiculares;
- b) Há uma associação inversa entre a imunomarcção da MMP-2 e área dos cistos radiculares, isto sugere que quanto menor o cisto radicular maior a imunoexpressão da MMP-2;
- c) Em cistos dentígeros e cistos radiculares menores que 200 mm², há uma correlação inversa entre a imunomarcção e o tamanho da lesão;
- d) Nos tumores odontogênicos ceratocísticos, há uma associação inversa entre a MMP-2 e a MMP-9, sugerindo que cada enzima esteja ligada a uma função no processo patológico. Isso pode sugerir que a MMP-2 esteja relacionada à invasão e a MMP-9 ao processo de proliferação, ou seja, potencial de agressividade;
- e) Os dados mostrados sugerem algumas hipóteses que podem contribuir para o entendimento do comportamento biológico de lesões uniloculares. Contudo há necessidade de mais estudos para esclarecer e comprovar tais teorias.

REFERÊNCIAS

- AIMES, R.T.; QUIGLEY, J.Q. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. **J Biol Chem**, v.270, n.11, p.5872-6, 1995.
- ALI, M.A.A. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic cysts. **Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.106, p.258-63, 2008.
- AUMAILLEY, M. Structure and supramolecular organization of basement membranes. **Kidney Int Suppl**, v.49, S4-7, 1995.
- BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press; 2005. WHO classification of tumours series.
- BENN, A.; ALTINI, M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicalpathologic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.81, p.203-9, 1996.
- BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration in invasion of cancer cells. **Biochem Biophys Acta**, v.1755, p.37-69, 2005.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.161-74, 2002.
- GROSS, J.; LAPIÈRE, C. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.48, p.1014-22, 1962.
- GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, p.345-57, 1996.
- HIGH, A.S.; ROBINSON, P.A.; KLEIN, C.E. Discrimination of parakeratinized odontogenic keratocysts from other odontogenic and non-odontogenic cyst types by expression of a 38kd cell-surface glycoprotein. **J Oral Pathol Med**, v.22, p.363-67, 1993.
- KOLAR, Z.; GEIEROVA, M.; BOUCHAL, J.; PAZDERA, J.; ZBORIL, V.; TVRDY, P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v.35, p.75-80, 2006.
- KUBOTA, Y.; YAMASHIRO, T.; OKA, S.; NINOMIYA, T.; OGATA, S.; SHIRASUNA, K. Relation between size of odontogenic jaw cysts and the pressure of fluid within. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.42, p.391-95, 2004.
- KUMAMOTO, H.; YAMAUCHI, K.; YOSHIDA, M.; Ooya, K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastoma. **J Oral Pathol Med**, v.32, p.114-20, 2003.

- LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **Internat Endod J**, v.36, p.454-71, 2003.
- MARTON, I.J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiology Immunol**, v.15, p.139-50, 2000.
- MAURETTE, P.E.; JORGE, J.; DE MORAES, M. Conservative treatment protocol of odontogenic keratocyst: a preliminary study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.64, n.3, p.379-83, 2006.
- MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; BANDO, Y.; HARRIS, M. Interleukin-1: the principal osteolytic cytokine produces by keratocysts. **Archs Oral Biol**, v.37, p.935-43, 1992.
- MIYAGI, S.P.H.; HIRAKI, K.R.N.; MARTINS, M.D.; MARQUES, M.M. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro. **J Oral Scienc**, v.50, n.2, p.187-92, 2008.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases. **J Oral Chem**, v.274, p.21491-94, 1999.
- NAKAMURA, T.; ISHIDA, J.; NAKANO, Y.; ISHII, T.; FUKUMOTO, M.; IZUMI, H.; KANEKO, K. A study of cysts in the oral region. Cysts of the jaw. **J Nihon Univ Sch Dent**, v.37, p.33-40, 1995.
- NAVARRO, V.P.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B.; FREITAS, A.C. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Rev Odont UNESP**, v.35, n.4, p. 233-38, 2006.
- NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; BOUQUOT, J.E. **Patologia oral e maxilofacial**. 2th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- OKA, S.; KUBOTA, Y.; YAMASHIRO, T.; OGATA, S.; NINOMIYA, T.; ITO, S.; SHIRASUNA, K. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. **J Dent Res**, v.84, n.10, p.913-18, 2005.
- OLIVEIRA, M.D.C.; MIRANDA, J.L.; AMORIM, R.F.B.; SOUZA, L.B.; FREITAS, R.A. Tenascin and fibronectin expression in odontogenic cysts. **J Oral Pathol Med**, v.33, p.354-9, 2004.
- PINHEIRO, J.J.V. Estudo imuno-histoquímico e zimográfico das metaloproteínas da matriz 1, 2 e 19 no ameloblastoma, 2002. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP.
- RIBEIRO, R. I. M. A.; BORGES-JÚNIOR, P. C.; CARDOSO, S. V.; CANDELARI, I.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão das metaloproteínas da matriz e seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **J Bras Patol Med**, v.44, n.2, p.115-21, 2008.

RIBEIRO, B. F.; IGLESIAS, D. P. P.; NASCIMENTO, G. J. F.; GALVÃO, H.C.; MEDEIROS, A. M. C. Immunoexpression of MMPs-1, -2, -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. **Oral Diseases**, v.15, p.472-77, 2009.

SAKAMOTO, A.; WEINSTEIN, L.S.; PLAGGE, A.; ECKHAUS, M.; KELSEY, G. GNAS Haploinsufficiency leads to subcutaneous tumor formation with collagen and elastin deposition and calcification. **Endoc Res**, v.34, n.1-2, p.1-9, 2009.

SANTOS, J.N.; OLIVEIRA, G.Q.V.; GURGEL, C.A.S.; SOUZA, R.O.; SALES, C.B.S.; VALENÇA-NETO, A.A.P.; RAMOS, E.A.G. Altered expression of cytokeratins in primary, recurrent and syndrome keratocystic odontogenic tumors. **J Mol Hist**, v.40, p.269-75, 2009.

SHAFFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M: **A Textbook of Oral Pathology**, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1983.

SCHOLL, R.J.; KELLETT, H.M.; NEUMANN, D.P.; LURIE, A.G. Cysts and cystic lesions of the mandible: clinical and radiologic-histopathological review. **Radiographics**, v.19, p.1107-24, 1999.

SHEAR, M. **Cistos da região buco-maxilo-facial – Diagnóstico e Tratamento**. 3 ed. São Paulo: Editora Santos, 1999.

SHEAR, M. Cysts of the jaws: recent advances. **J Oral Pathol**, v.14, p.43-59, 1985.

SILVEIRA, E.J.D.; PIVA, M.R.; GALVÃO, H.C.; SOUZA L.B.; FREITAS, R.H. Participação das metaloproteínas da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. **J Bras Patol Med Lab**, v.43, n.3, p.203-9, 2007.

SOARES, A.F.; LEMOS, J.C.; GALVÃO, H.C.; FREITAS, R.A.; SOUZA, L.B. Expressão das MMPs -1, -2 e -9 em cistos radiculares com e sem tratamento endodôntico. **Odontol Clin Cientif**, v.6, n.3, p.249-54, 2007.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p.463-516, 2001.

TERONEN, O.; SALO, T.; KONTTINEN, Y.T.; RIFKIN, B.; VERNILLO, A.; RAMAMURTHY, N.S.; KJELDSEN, L.; BORREGAARD, N.; HIETANEN, J.; SORSA, T. Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. **J Oral Pathol Med**, v.24, p.78-84, 1995.

TERONEN, O. Jaw cystic matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibition of MMPs by biphosphonates. 1998. Tese de Doutorado, Universidade de Helsinki, Finlândia.

TREXLER, M.; BRIKNAROVÁ, K.; GEHRMANN, M.; LLINÁS, M.; PATTHY, L. Peptide ligands for the fibronectin type II modules of matrix metalloproteinase 2. **J Biol Chem**, v.278, n.14, p.12241-46, 2003.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissues Inhibitors of Metalloproteinases – Structure, function and biochemistry. **Circ Res**, v.92, p.827-39, 2003.

WAHLGREN, J.; VÄÄNÄNEN, A.; TERONEN, O.; SORSA, T.; PIRILÄ, E.; HIETANEN, J.; MAISI, P.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.2, p.100-7, 2003.

ZICCARDI, V.B.; EGGLESTON, T.I.; SCHNEIDER, R.E. Using fenestration technique to treat a large dentigerous cyst. **JADA**, v.128, p.201-5, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

APÊNDICE 2: Correlation between radiographic area and immunolocation of MMP-2 and MMP-9 in dentigerous cysts, radicular cysts and unilocular keratocystic odontogenic tumors.

APÊNDICE 1: Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Andamento do projeto - CAAE - 0035.0.091.000-09				
Título do Projeto de Pesquisa Estudo imuno-histoquímico de componentes da matriz extracelular em cistos odontogênicos				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	22/07/2009 14:22:31	15/10/2009 14:13:27		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
4 - Protocolo Aprovado no CEP	15/10/2009 14:13:27	Folha de Rosto	764.099.09.07	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	05/07/2009 11:28:32	Folha de Rosto	FR276204	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	22/07/2009 14:22:31	Folha de Rosto	0035.0.091.000-09	CEP
3 - Protocolo Pendente no CEP	12/08/2009 17:51:08	Folha de Rosto	764.099.09.07	CEP

APÊNDICE 2: Correlation between radiographic area and immunolocation of MMP-2 and MMP-9 in dentigerous cysts, radicular cysts and unilocular keratocystic odontogenic tumors

Running head: Immunolocation of MMP-2 and MMP-9 in unilocular radiographic lesions

Authors:

Rafaela SCARIOT de Moraes

Allan Fernando GIOVANINI*

Nelson Luis Barbosa REBELLATO

Renato Cordeiro GUGISCH

Affiliation:

Universidade Federal do Paraná/Curso de Odontologia

Departamento de Estomatologia

Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico

CEP: 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

* Universidade Positivo/Curso de Odontologia

Corresponding author:

Rafaela Scariot de Moraes

Dr. Brasília Vicente de Castro, 320 Ap 403 – Campo Comprido

CEP: 81200-340 Curitiba, PR, Brazil

PHONE: 055 41 32859394

E-mail: rafaela_scariot@yahoo.com.br

There was no source of support in the form of grants.

Key words: Jaw cysts; Metalloproteins; Radiography

Abstract

Unilocular bone cysts are the most common entities affecting the maxillofacial region. However, the mechanism of proliferation and expansion remains unclear. Metalloproteinases (MMPs) are associated to diverse pathological conditions. The aim of the present study was to correlate the radiographic aspect (area) and the presence of MMP-2 and MMP-9 in dentigerous cysts, radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. The sample was composed by 10 dentigerous cysts, 9 radicular cysts and 8 keratocystic odontogenic tumors. The radiographic area of each lesion was calculated using the mathematical formula of the ellipse area. All specimens were subjected to immunohistochemical analysis for these enzymes. Immunopositivity of the enzymes were classified into scores as absent, present or strongly present. The average radiographic area was 284.17 mm², 235.81 mm² and 381.81 mm², respectively. Immunopositivity of the enzymes was classified with scores. Statistical analyses revealed no association between the immunoreactivity of MMPs and radiographic area of the lesions in all pathologies studied ($p > 0.05$), except for MMP-2 and radicular cysts ($p = 0.02$; $r_s = -0.659$), for which smaller lesions had increased immunostaining for this enzyme. The results demonstrate that quantities of MMP-2 and MMP-9 are especially involved with dentigerous and radicular cysts in expansion, whereas these enzymes seem to be related to the biological behavior of keratocystic odontogenic tumors, indicating invasion and cell proliferation. Moreover, there is an inverse association between MMP-2 and MMP-9 in keratocystic odontogenic tumors ($p = 0.03$; $r_s = -0.660$), indicating activity in different regions.

Introduction

Cysts are developmental, inflammatory or neoplastic disorders presenting as a pathological cavity with its lumen filled with liquid or semi-solid material lined with epithelium surrounded by a rich stroma forming a capsule.¹⁴ Lesions that exhibit this architectural pattern are the most common form of intraosseous pathological entities that affect the maxillofacial region.⁶ From the epidemiological standpoint, the most frequent lesions exhibiting these patterns are radicular cysts (RC), dentigerous cysts (DC) and keratocystic odontogenic tumors (KCOT).¹⁰

A number of studies have demonstrated the importance of the proliferation and expansion potential of these entities and consequent osteolysis. These factors are generally associated to the synthesis of proteins or enzymes that modify the homeostasis of the cystic epithelium and extracellular matrix (ECM), particularly in KCOTs.¹²

Metalloproteinases (MMPs) are proteolytic, zinc-dependent enzymes secreted by epithelial and conjunctival cells that play an important role in a number of physiological and pathological conditions, such as tissue remodeling and cell invasion cellular.^{2,3,5} MMPs are classified based on their structure and the specificity of their substrates. MMP-2 (72kDa) and MMP-9 (92kDa) are gelatinases and play specific roles in the degradation of ECM macromolecules. These enzymes contain three repetitions of a fibronectin II domain in their catalytic domain, which aid in the degradation of type IV collagen, gelatins and elastin.¹⁷ Thus, MMP-2 and MMP-9 are correlated to mesenchymal cell differentiation, proliferation and migration, enhanced collagen affinity, anti-inflammatory activity, reduced Interleukin-2 response and other processes.¹⁷ When out of balance, these biological processes can influence the behavior of any pathology.

The aim of the present study was to correlate radiographic aspects and immunopositivity for MMP-2 and MMP-9 in DCs, RCs and KCOTs.

Materials and Methods

Sample selection: The histopathological specimens of patients having undergone biopsy at the School of Dentistry of the *Universidade Federal do Paraná* (Brazil) between 2005 to 2009 with a confirmed diagnosis of DC, RC or KCOT were selected. Besides the histopathological material, panoramic radiographs performed at the same institution prior to treatment were also part of the inclusion criteria. The study received approval from the ethics committee of the institution under process number CAAE 00350091000-09.

Radiographic analysis: All panoramic radiographs were analyzed on an Ortophos CD® orthopantomograph (Siemens, Berlin, Germany) at the Department of Dental Radiology of the institution. As all lesions studied were unilocular, the area of each lesion was measured. For such, the principal axes (Axis 1 – height; Axis 2 – length) were measured in millimeters using a digital caliper (Vonder, Curitiba, Paraná, Brazil). These measurements corresponded to the diameters of the lesions, which had an elliptical shape. Radiographic interpretation of each lesion was performed three different times at two-week intervals by a single calibrated examiner in a dark room with a proper light box. Measurements obtained on each axis were tabulated and statistically evaluated as to their reliability using the intraclass correlation coefficient with a 95% confidence interval. The average of the each axis value was subtracted from a predetermined magnification value of the panoramic radiograph in

order to obtain the actual measurement of the lesion in two dimensions. The area of each lesion was calculated in mm² using a mathematical formula [area of ellipsis: $\pi \times \text{radius1 (Axis 1/2)} \times \text{radius 2 (Axis 2/2)}$].

Immunohistochemistry procedure: Cuts three micrometers in thickness of each specimen were deparaffinized and submitted to antigen retrieval in 1N trypsin solution (pH 7.2) for 60 min at 37° C. The slides containing the histological specimens were immersed in 3% hydrogen peroxide for 30 min to extinguish endogenous peroxidase activity, followed by incubation with 1% phosphate-buffered saline (pH 7.4). The sections were incubated overnight with the primary antibody anti-MMP2 (NCL-MMP-2-507 – Mouse Monoclonal – Novocastra® – Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) and anti-MMP9 (NCL-MMP-9-439 – Mouse Monoclonal – Novocastra® – Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK), both with dilution factor of 1:20. The labeled streptavidin biotin (Advance TM HRP Label – Link and Enzyme - K4068 - Dako® - Glostrup/Germany) antibody-binding detection system was used to detect the primary antibodies. The immunoreaction was revealed with 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, St Louis/USA) for 3 min, producing a brown precipitate at the antigen site. The specimens were counterstained with Harris hematoxylin. For each specimen, three slides were used for incubation with each antibody.

Immunohistochemical analysis: MMP-2 and MMP-9 immunoreactivity was determined qualitatively (descriptive) and quantitatively. All sections were examined under a light microscope at magnifications of $\times 40$ and $\times 100$. Two evaluators analyzed the presence or absence of immunoreactivity to the proteases, characterizing the reaction as (-) negative, (+) positive or (++) strongly positive, based on KUMAMOTO *et al.*⁷

Statistical analysis: The results were submitted to statistical analysis. Computations were made using the Statistical Package for the Social Sciences® (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The association of the variables (immunostaining and area of lesion) was determined using Spearman's rank correlation coefficient, with the significance level set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Based on the eligibility criteria, the sample was composed 10 DCs, 9 CRs and 8 KCOTs.

Radiographic analyses

All lesions examined had a unilocular radiographic appearance. The mean length (mm) of Axis 1 and Axis 2 was determined for the morphometric radiographic analysis. The intraclass coefficient correlation (ICC) was determined for each value and proved to be a useful tool. Magnification of the image was 13.67% for the region of the incisors and canines, 25.92% for the region of the premolars and 23.48% for the region of the molars. The mean area of the DCs, RCs and KCOTs was 284.17 mm², 235.81 mm² and 381.81 mm², respectively (Table 1).

Immunohistochemical analyses

A detailed description of the qualitative data is described below, while the quantitative results are displayed in Tables 2 and 3.

MMP-2: In dentigerous and radicular cysts, MMP-2 was present in the entire cystic capsule, with greater positivity on the edge of the capsule adjacent to the remaining bone tissue (Fig. 1A, 1B, 1C). In radicular cysts, besides the region of bone edge,

there was also MMP-2 immunostaining in areas of chronic inflammation and overlapping areas in the region in which epithelial projections were evident (Fig 1D). In contrast, KCOTs exhibited immunopositivity to MMP-2 particularly adjacent to cystic epithelium in loci in which the interaction between the epithelium and connective tissue was lost (Fig. 1E and 1F). **MMP-9:** Immunolocalization of MMP-9 in DCs and RCs presented a similar pattern, occurring mainly in the epithelium and randomly in the cystic capsule (Fig. 2A, 2B, 2C). The RCs exhibited greater immunostaining in inflammatory areas (Fig. 2D). The KCOTs had larger and stronger areas positive to MMP-9, which was expressed in both the capsule and epithelium (Fig. 2E and 2F).

Correlation between immunostaining of MMPs and radiographic appearance:

No associations were found between the immunostaining and the area of radiographic lesions, except for an inverse correlation between MMP-2 and RCs ($p = 0.02$; $r_s = -0.659$), for which smaller lesions had increased immunostaining for this enzyme. The samples of all lesions were divided into two groups based on the mean area of the lesions: greater than 200 mm² and smaller than 200 mm². For lesions smaller than 200 mm², there was an inverse association between lesion size and immunoreactivity ($p = 0.013$; $r_s = -0.593$). Moreover, in the KCOTs, there was an inverse association between MMP-2 and MMP-9 ($p = 0.03$; $r_s = -0.660$).

Discussion

Cystic entities are found in a wide range of developmental, inflammatory and neoplastic diseases and are composed of epithelial tissue surrounding a cavity linked to a capsule composed of connective tissue.¹⁴ Despite the similar microarchitecture,

significant epidemiological, behavioral and biological differences are found in these pathologies.

In the radiographic analysis, all lesions revealed a unilocular aspect associated with a sclerotic halo, with the latter finding only constant among dentigerous and radicular cysts. The mean size was different between the pathological entities. KCOTs were larger in comparison with other cysts studied, which is consistent with findings described in the literature.¹⁰ The mean size of the dentigerous and radicular cysts was 284.17 mm² and 235.81mm², respectively. Although the mean size of the DCs and RCs was greater than 200 mm², 13 of these cysts (68.42%) had areas smaller than 200 mm². These cysts had an inverse correlation between lesion area and immunopositivity for both MMP-2 and MMP-9, with smaller DCs and RCs exhibiting greater immunoreactivity to these enzymes. These data suggest greater enzyme activity in the earlier development stages of these cysts, providing further degradation of ECM components.

In all specimens of DCs and RCs smaller than 200 mm², the results indicate that the presence of MMP-2 was intense and coincided with the edges adjacent to bone. These results corroborate previous studies describing the importance of this enzyme in the process of cystic expansion.^{1,4} The present study also reveals that, in the early stages of the lesion, MMP-2 not only digests denatured collagen I more slowly, but may also be responsible for inducing the formation of the sclerotic rim in DCs and RCs. This hypothesis is supported by findings described by SAKAMOTO *et al.*, who demonstrated the presence of calcification associated with an increased amount of MMP-2, suggesting a direct association between calcium deposition and ECM degradation.¹³ The authors point out that there are no specific markers for bone lineage in this process, confirming that calcification associated to MMP-2 is not

secondary to ossification, but rather the deposition of a pathological form of calcium. In the present study, this phenomenon also occurred in six DCs and RCs with a mean area larger than 200 mm².

Comparing only the immunoexpression of MMP-2 in the DCs and RCs, scores were higher in the former. With respect to the immunostaining of MMP-2 and RCs, there was a prevalence of this enzyme in the mesenchyme, mainly associated with inflammatory cells and areas coinciding with the formation of epithelial projections. Statistically, there was an inverse correlation between lesion area and immunostaining in the cyst, which may mean that the inflammatory process is greater in immature lesions of an endodontic origin than mature lesions. It is suggested that MMP-2 in RCs triggers a chain of osteolytic events, stimulated initially by cells in the inflammatory process. MMP-9 was also found in most of the cystic capsule of the DCs and RCs, again linking this enzyme to expansion.

In the KCOTs, intense expression of MMP-2 and MMP-9 was found in the epithelium and mesenchyme. Although odontogenic tumors have a keratocystic immunostaining score similar to that of DCs, the location of MMP-2 in KCOTs is different. This enzyme occurred throughout the entire conjunctive capsule, indicating greater osteolytic action in the capsule in comparison to developmental cysts. The presence of IL-1 α in cyst fluid of the KCOTs may help in understanding this result. MEGHA et al. and TERONEN et al. found that levels of IL-1 α are significantly higher in the cyst fluid of keratocystic odontogenic tumors than that of other cysts.^{8,11} OKA et al. found that the positive pressure of the fluid induced bone resorption in KCOTs, since the increased expression of IL-1 α induces the secretion of MMP-1, MMP-2 and MMP-3, which are responsible for bone resorption.¹¹

Moreover, MMP-2 is known to have an affinity for laminin and type IV collagen, which are the main constituents of the basal lamina.¹⁸ This indicates that MMP-2 may be related to the breakdown of the basal lamina, inducing the process of tumor invasion of the epithelium for the formation of offspring or satellite cysts. This appears to have occurred in the specimens analyzed in the present study, as labeling for MMP-2 was found in the basal lamina region of the epithelium and primary cystic areas suggestive of offspring cysts.

An interesting finding was that regions with immunostaining for MMP-2 revealed no expression of MMP-9, suggesting that MMP-2 plays a different role from that of MMP-9, despite their similar structural conformation and its regulatory power over MMP-9, which makes it inactive. In the KCOT specimens studied here, it may be suggested that the intense presence of MMP-9 occurred due to the regulatory inefficiency of MMP-2, as occurs in neoplastic alterations.⁹ Thus, although MMP-9 is immunolabeled in different areas of MMP-2, it was more intense than MMP-2 in the KCOTs, indicating that the presence of MMP-9 is related not only to cystic expansion, but also to the aggressiveness of the lesion. Confirming this hypothesis, SILVEIRA et al. report that the strong presence of MMP-9 in the components of mesenchymal KCOTs may explain its aggressive behavior.¹⁵

In summary, with the exception of MMP-2 and radicular cysts, MMPs are not associated to the area of the lesion. MMP-2 and MMP-9 appear to be related to cystic expansion in DCs and RCs. For these pathological entities, it can be said that smaller lesions are associated to greater bone degradation. In KCOTs, MMP-2 and MMP-9 act in different regions, suggesting that MMP-2 breaks down the basal lamina, allowing tumor invasion, and MMP-9 stimulates proliferation and migration, determining the aggressiveness of the disease.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. Fernanda de Moraes Ferreira her assistance on statistical analyses of the manuscript.

References

1. Aimes RT, Quigley JQ. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1995; 270(11): 5872-76.
2. Ali MAA. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic cysts. *Med oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:258-63.
3. Aumailley M. Structure and supramolecular organization of basement membranes. *Kidney Int Suppl* 1995; 49: S4-7.
4. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration in invasion of cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1755: 37-69.
5. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-57.
6. High AS, Robinson PA, Klein CE. Discrimination of parakeratinized odontogenic keratocysts from other odontogenic and non-odontogenic cyst types by expression of a 38kd cell-surface glycoprotein. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 363-367.
7. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32:114-20.
8. Meghji S, Henderson B, Bando Y, Harris M. Interleukin-1: the principal osteolytic cytokine produced by keratocysts. *Archs Oral Biol* 1992; 37: 935-43.
9. Miyagi SPH, Hiraki KRN, Martins MD, Marques MM. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro. *J Oral Scienc*, 2008;50:2:187-92.
10. Neville BW, Damm DD, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 2th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
11. Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2005;84(10): 913-18.

- 12.Oliveira MDC, Miranda JL, Amorim RFB, Souza LB, Freitas RA. Tenascin and fibronectin expression in odontogenic cysts. J Oral Pathol Med 2004;33: 354-9.
- 13.Sakamoto A, Weinstein LS, Plagge A, Eckhaus M, Kelsey G. GNAS Haploinsufficiency Leads to Subcutaneous Tumor Formation With Collagen and Elastin Deposition and Calcification. Endoc Res 2009: 34: 1-2 :1-9.
- 14.Shear M. Cistos da região buco-maxilo-facial – Diagnóstico e Tratamento. 3 ed. São Paulo: Editora Santos, 1999.
- 15.Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RH. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. J Bras Patol Med Lab 2007: 43(3): 203-9.
- 16.Teronen O, Salo T, Konttinen YT, Rifkin B, Vernillo A, Ramamurthy NS, Kjeldsen I, Borregaard N, Hietanen J, Sorsa T. Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. J Oral Pathol Med 1995;24: 78-84.
- 17.Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissues Inhibitors of Metalloproteinases – Structure, function and biochemistry. Circ Res 2003: 92: 827-39.
- 18.Wahlgren J, Väänänen A, Teronen O, Sorsa T, Pirilä E, Hietanen J, Maisi P, Tjäderhane L, Salo T. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. J Oral Pathol Med 2003: 32(2): 100-7.

Table 1: Partial measures and final area obtained for each lesion.

<i>Odontogenic Pathology</i>	<i>Mean Axis 1 (mm)</i>	<i>Mean Axis 2 (mm)</i>	<i>Mean Axis 1 subtracted to magnification (mm)</i>	<i>Mean Axis 2 subtracted to magnification (mm)</i>	<i>Final Area of Lesion (mm²)</i>
Dentigerous Cyst ICC: 0.991	27.69	27.16	20.51	20.12	323.93
	17.86	21.34	13.66	16.32	175
	11.84	12.79	10.22	11.04	88.57
	14.59	17.64	12.59	15.22	150.30
	15.33	18.66	13.23	16.01	166.27
	13.56	23.63	11.70	20.39	187.27
	18.77	18.98	13.90	14.06	153.41
	48.65	47.26	41.99	40.79	1344.20
	22.18	15.89	16.97	12.15	161.76
	10.18	19.49	7.78	14.91	91.05
Radicular Cyst ICC: 0.996	35.08	24.42	30.28	21.08	501.06
	14.01	15.20	12.09	13.12	124.41
	12.49	12.97	10.78	11.19	94.69
	33.27	20.86	28.72	18.00	405.81
	23.69	15.88	20.45	13.70	219.82
	37.27	24.82	32.17	21.42	540.76
	12.03	20.79	10.38	17.94	146.18
	11.55	11.35	8.55	8.40	56.31
	10.44	6.95	7.98	5.31	33.26
Keratocystic Odontogenic Tumour ICC:0.987	33.23	30.49	24.61	22.58	436.04
	21.31	17.37	18.39	14.99	216.28
	35.15	34.86	26.91	26.67	563.17
	19.28	18.85	16.64	16.27	212.52

	13.07	14.72	10.00	11.26	88.39
	43.14	26.47	33.01	20.25	524.57
	19.31	18.23	14.77	13.94	161.51
	48.45	40.84	35.89	30.25	852.01

ICC: Intraclass coefficient correlation

Table 2: Description of the quantitative data of the immunohistochemistry to MMP-2.

<i>MMP-2</i>						
	DC		RC		KCOT	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
-	2	20	4	44,4	3	37,5
+	5	50	3	33,3	2	25
++	3	30	2	22,3	3	37,5
Total	10	100%	9	100%	8	100%

Table 3: Description of the quantitative data of the immunohistochemistry to MMP-9

<i>MMP-9</i>						
	DC		RC		KCOT	
	n	(%)	N	(%)	n	(%)
-	4	40	1	11,2	1	12,5
+	4	40	4	44,4	1	12,5
++	2	20	4	44,4	6	75
Total	10	100%	9	100%	8	100%

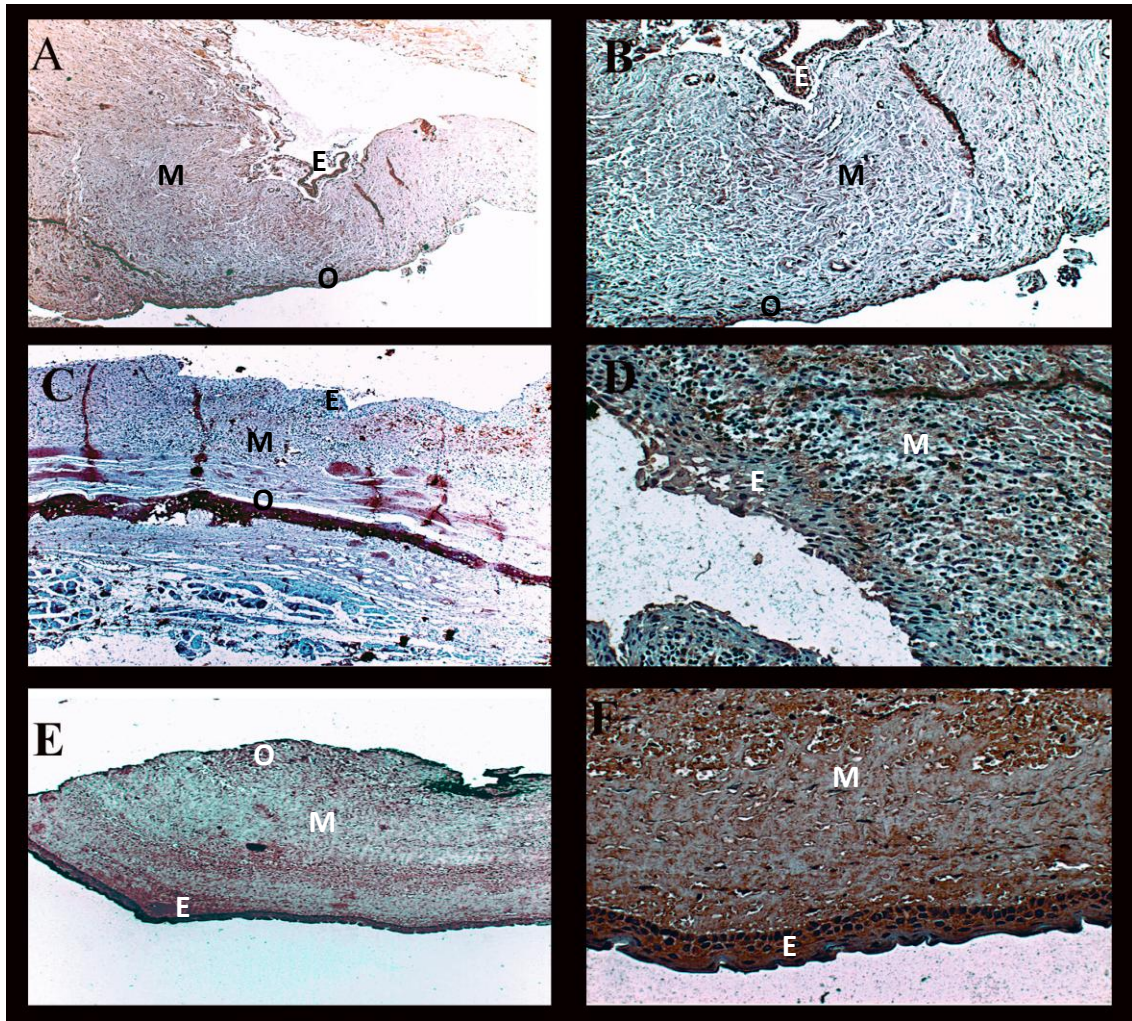


Figure 1: Board of histological slides with the immunostaining for MMP-2 in DC (A and B), RC (C and D) and KCOT (E and F), in 40x and 100x.

E: Epithelium

M: Mesenchyme

O: Area in contact with border bone

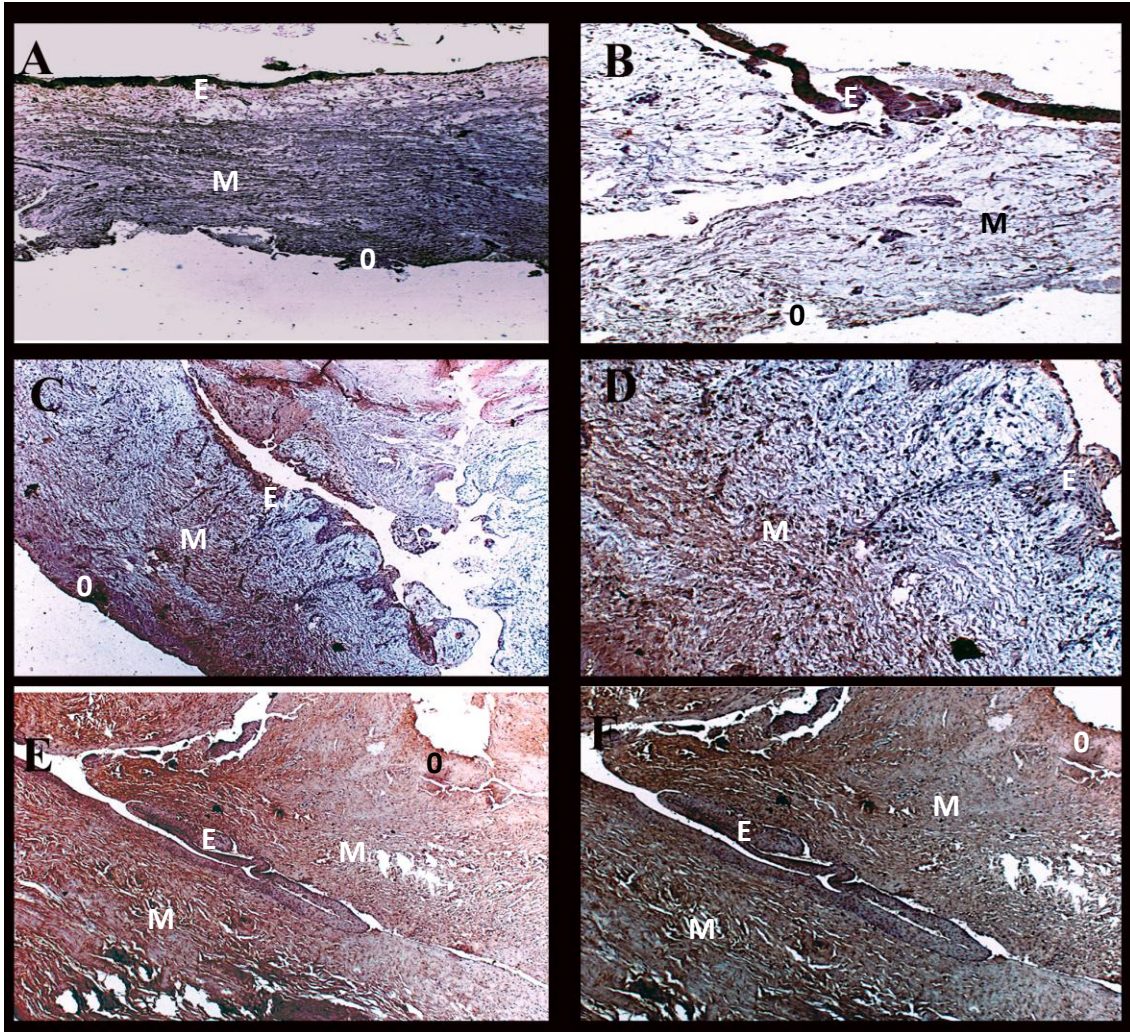


Figure 2: Board of histological slides with the immunostaining for MMP-9 in DC (A and B), RC (C and D) and KCOT (E and F), in 40x and 100x.

E: Epithelium

M: Mesenchyme

O: Area in contact with border bone

ANEXO

ANEXO I: International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

Guide for Authors

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms>. A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at authorsupport@elsevier.com. Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form ([pdf version](#) or [word version](#)) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following:

- (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data
- (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content
- (3) final approval of the version to be submitted.

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references. The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form

This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. ([pdf version](#) or [word version](#)) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent

applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Work on human beings that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki (Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions.

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

Article Types

The following contributions will be accepted for publication. *Please take careful note of the maximum length where applicable.* Overlength articles will be returned to the

authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be:

- focused
- based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
- well written in simple, scientific English grammar and style
- presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal
- Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within **3 months**; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round.

Format Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- title page
- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information:

- title of the article
- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants
- key words

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

Introduction

-
- Present first the nature and scope of the problem investigated
 - Review briefly the pertinent literature
 - State the rationale for the study
 - Explain the purpose in writing the paper
 - State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
 - Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references
- Should be written in the past tense
- Include exact technical specifications, quantities and generic names
- Limit the number of subheadings, and use the same in the results section
- Mention statistical method
- Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results
- Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data
- Show how results agree/contrast with previous work
- Discuss the implications of your findings
- State your conclusions very clearly.

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$;

P<0.001). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK).

The minus sign should be -.

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The accuracy of references is the responsibility of the author; please refer to a recent issue of the journal to familiarise yourself with the reference style. All authors or groups of authors cited in the article must appear in the list of references and vice versa. References in the text should use superscript numerals with or without the name(s) of the author(s): "Kenneth and Cohen¹⁴ showed?", "it has been shown¹⁴ that?" When a cited paper has more than two authors; the citation in the text should appear as "Halsband et al." **The list of references at the end of the paper should be arranged alphabetically and numbered, and must contain the name of all authors.** All references cited in the text must be included in the list of references. Clinical and research articles should have a maximum of 25 references and case reports no more than 10.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see

www.nlm.nih.gov.uk) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. Fundamentals of oral surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: Fluorine chemistry. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly.

The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even

white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. **The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.**

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Patient confidentiality: Where illustrations must include recognizable individuals, living or dead, great care must be taken to ensure that consent for publication has been obtained. If identifiable features are not essential to the illustration, please indicate where the illustration can be cropped. In cases where consent has not been obtained and recognizable features may appear, it will be necessary to retouch the illustration to mask the eyes or otherwise render the individual unrecognizable.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not

wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html>

There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words and 6 references. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.

-
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
 3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
 4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.
 5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
 6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
 7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
 8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.